

**Волошина Александра Дмитриевна**

**Антимикробные и токсические свойства макроциклических и ациклических  
ониевых производных урацила**

03.02.03 – микробиология

**Автореферат**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

Работа выполнена в лаборатории химико-биологических исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра Российской академии наук»

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор  
**Зобов Владимир Васильевич**

**Официальные оппоненты:** доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий кафедрой эпизоотологии и инфекционных болезней с ветеринарной санитарией факультета ветеринарной медицины ФГБОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э.Баумана»  
**Равилов Рустам Хаметович**

доктор медицинских наук, профессор, кафедры микробиологии ГБОУ ВПО «Казанский медицинский университет»  
**Мусина Линара Табрисовна**

**Ведущая организация:** ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет»

Защита диссертации состоится «29» октября 2015г. в ч. на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420055, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 74, в зале заседания ученого совета (аудитория 205).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н. И. Лобачевского при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: г. Казань, ул. Кремлевская, д. 35.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук

**З.И. Абрамова**

**Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.** В настоящее время описано более 20 тысяч природных веществ и синтезированы сотни тысяч индивидуальных химических соединений с антимикробными свойствами, воздействующих на патогенных возбудителей различной природы. Однако широкое применение этих лекарственных средств, приводит к ряду явлений, осложняющих возможность их рационального использования. К ним относятся: возникновение аллергических реакций, наличие серьезного токсического действия на организм, а также развитие лекарственной резистентности патогенных микроорганизмов к используемым антимикробным препаратам.

В связи с этим приобретают особую актуальность и значимость исследования, посвященные целенаправленному поиску высокоэффективных малотоксичных препаратов с широким спектром действия в рядах новых перспективных антимикробных агентов.

Пиримидиновые производные, вследствие значительного разнообразия присущих им полезных свойств, давно привлекают к себе пристальное внимание, как химиков-синтетиков, так и специалистов смежных областей. Целый ряд лекарственных средств на основе пиримидиновых производных в настоящее время широко применяется в медицинской практике. Их используют как фармацевтические препараты, обладающие антимикробными, противовоспалительными, противораковыми, регенерирующими и антималярийными свойствами (Машковский, 2012; Hugo et al., 1987).

Соединения, содержащие ониеую группу, давно вызывают большой интерес исследователей в области химиотерапии. В настоящее время они имеют широкую область применения: терапевтическая антисептика местных гнойно-воспалительных процессов, профилактическая антисептика неповрежденной кожи перед операциями, антисептика слизистых оболочек; консервирование глазных капель, инъекционных растворов, зубных паст, косметических средств и др. Типичные представители ониеовых производных – бензалкония хлорид, бензалкония пропионат, мететрония метилсульфат. Бензалкония хлорид обладает широким спектром антимикробного действия в отношении целого ряда патогенных микроорганизмов и входит в состав многих известных лекарственных средств: фарматекс, бенатекс, септолете (Опарин, 2003; РЛС Энциклопедия лекарств, 2012).

Антимикробная активность ониеовых соединений является предметом многочисленных публикаций (Корочкина и др., 2010; Корочкина и др., 2011; Кудрявцев и др., 2011; Миргородская и др., 2011; Zhiltsova et al., 2012; Mirgorodskaya et al., 2014; Pashirova et al., 2015; Kenawy, 2007). Однако практически отсутствуют работы, посвященные изучению антимикробной активности макроциклических и ациклических ониеовых производных урацила.

В связи с этим поиск новых оригинальных препаратов с широким спектром антимикробной активности и низкой токсичностью по отношению к млекопитающим в рядах макроциклических и ациклических ониеовых производных урацила является актуальным.

В соответствии с вышеизложенным, **целью** работы явилось исследование антимикробных и токсических свойств новых макроциклических и ациклических ониеовых

производных урацила.

#### **Основные задачи исследования:**

1. Охарактеризовать антимикробную активность макроциклических и ациклических ониевых производных урацила.
2. Проанализировать связь «структура-активность» в рядах исследуемых соединений.
3. Исследовать влияние ониевых производных урацила на активность ферментов дегидрогеназ и липаз, а также на биосинтез биомаркерных рибосомных белков *Escherichia coli F 50*.
4. Оценить острую токсичность на лабораторных млекопитающих (мыши внутрибрюшинно).
5. Исследовать генотоксические и гемолитические свойства макроциклических и ациклических ониевых производных урацила.
6. Дать сравнительную оценку потенциала практического применения макроциклических и ациклических ониевых производных урацила в качестве антимикробных средств.

**Научная новизна.** Впервые изучена антимикробная активность новых химических соединений; выявлены особенности молекулярной структуры, обеспечивающие низкие значения МИК (минимальной ингибирующей концентрации) на уровне известных лекарственных препаратов (ципрофлоксацина, офлоксацина, клотримазола, амфотерицина В, кетоконазола) и умеренные значения токсичности на лабораторных мышах. Исследованные соединения не являются гемолитическими агентами. В тесте Эймса показано отсутствие их генотоксичности. Макроциклические и ациклические ониевые производные урацила впервые предложены к разработке как антимикробные препараты.

**Практическая значимость работы.** Основным практическим достижением настоящей работы является выявление в рядах макроциклических и ациклических производных урацила соединений с высокой антимикробной активностью на уровне известных эталонов. Макроциклические ониевые производные урацила демонстрируют селективные свойства в отношении грамположительных бактерий. Ациклические ониевые производные оказались менее специфичными и проявили высокую антимикробную активность как в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, так и в отношении грибов. Установленные результаты в совокупности с данными, свидетельствующими об отсутствии, у исследованных соединений, мутагенных и гемолитических свойств, а также о проявлении умеренно токсических свойств по отношению к лабораторным мышам, открывают перспективу их использования для лечения бактериальных и грибковых инфекций человека и животных.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Среди 37 исследованных соединений оптимальное сочетание целевых антимикробных и побочных токсических свойств (острая токсичность, гемолитическая активность, генотоксичность) проявляется в ряду ациклических производных аллоксазина.

2. В отношении грамположительных бактерий макроциклические и ациклические производные урацила демонстрируют антимикробную активность на уровне ципрофлоксацина и офлоксацина (МИК = 0,2-3,9 мг/л); в отношении грамотрицательных бактерий наиболее активны ациклические производные хиназолин-2,4-диона и аллоксазина (МИК=3,1-31,3 мг/л); в отношении грибов наиболее активны ациклические производные аллоксазина и урацила (МИК= 0,39 – 3,9 мг/л).

3. Ациклические производные аллоксазина вызывают угнетение активности дегидрогеназ и липаз *S. aureus* 209-Р и *C. albicans* 885-653 на (38-82%); все исследованные соединения оказывают воздействие на биосинтез белка в клетках *E. coli* F 50.

**Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования.**

Работа выполнена в лаборатории химико-биологических исследований ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, является частью исследований в соответствии с научным направлением Института по государственным бюджетным темам «Синтез и изучение структуры, химических и биологических свойств макроциклических соединений, содержащих в своем составе пиримидиновые и триазиновые фрагменты» (№ госрегистрации 0120.0005796); «Функционализация клешневидных и макроциклических соединений, содержащих N-гетероароматические и карбоциклические фрагменты, с целью придания им практически полезных свойств (№ госрегистрации 0120.0503489). Работа поддержана программами ОХНМ РАН «Химия и физикохимия супрамолекулярных систем и атомных кластеров», «Биомолекулярная и медицинская химия», «Медицинская химия», программой Президиума РАН «Разработка методов получения химических веществ и создание новых материалов», Федеральными целевыми программами «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (г/к № 02.513.12.0018), «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (соглашение № 8432) и грантами РФФИ: № 07-03-00392-а «Амфифильные макроциклические соединения, содержащие пиримидиновые фрагменты: синтез, катализ, самоорганизация», № 10-03-00365-а «Синтез и свойства криптандоподобных и наноразмерных пиримидинофанов».

**Апробация работы.** Основные результаты работы доложены и обсуждены в сборнике «Новые лекарственные средства: успехи и перспективы» (Уфа: Гилем, 2005); сборнике «Химия и биологическая активность синтетических и природных соединений, Азотсодержащие гетероциклы» (Москва, 2006); на International symposium «Advances in synthetic and medicinal chemistry» (St. Petersburg, 2007); научной конференции «Органическая химия для медицины» (Орхимед – 2008) (Москва, 2008); научно-практической конференции «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения» (Крым, Украина, 2009); научно-практической конференции «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения» (Крым, Украина, 2011); 47<sup>th</sup> International

Conference on Medicinal Chemistry “Drug discovery and selection” (Lyon, France, 2011); International Congress on Organic Chemistry (Kazan, Russian Federation, 2011); 17<sup>th</sup> European Symposium on Organic Chemistry “ESOC2011” (Hersonissos, Crete, Greece, 2011); первой Российской конференции по медицинской химии (MedChem Russia – 2013), (Москва, 2013).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 6 работ, в том числе 3 статьи в международных журналах и три статьи в российских журналах, удовлетворяющих требованиям ВАК.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из стандартных разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов исследования, их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 107 страницах, содержит 12 таблиц и 27 рисунков. Библиография содержит 116 наименований российских и зарубежных авторов.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю д.б.н., профессору В.В. Зобову за поддержку и внимательное отношение к работе; своему первому научному руководителю к.б.н. Ж.В. Молодых за привитый интерес к исследуемой проблеме; коллективу лаборатории химико-биологических исследований ИОФХ им. А.Е. Арбузова за помощь в проведении микробиологических и токсикологических исследований; д.х.н., профессору В.С. Резнику, д.х.н. В.Э. Семенову и коллективу лаборатории химии нуклеотидных оснований ИОФХ им. А.Е. Арбузова за предоставленные для исследований соединения, научные консультации, всестороннюю помощь и поддержку; выражает глубокую признательность заведующему кафедрой микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии д.б.н., профессору О.Н. Ильинской за огромную помощь в написании диссертации; доценту кафедры микробиологии к.б.н., А.Б. Маргулис за помощь в проведении испытаний на генотоксичность. Благодарность выражается зав. лаборатории физико-химического анализа ИОФХ им. А.Е. Арбузова, к.х.н. И.Х. Ризванову и аспирантке КФУ А.С. Стробыкиной за помощь в проведении исследований на MALDI-TOF масс-спектрометре Autoflex («Bruker Daltonics», Германия).

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **1. Материалы и методы**

#### **1.1. Соединения и тест-объекты использованные в экспериментах**

В качестве эталонов были использованы препараты коммерческого происхождения (субстанции антибиотиков ципрфлоксацина, офлоксацина, стрептомицина, грамицидина С и противогрибковых средств клотримазола, кетоконазола, амфотерицина В) (Sigma). Триэтилдециламмония бромид (простой аналог исследуемых соединений, исследованный во всех тест-системах в качестве модельного соединения, содержащего те же специфические фармакофоры (децильный радикал и ониеую группу), 22 представителя макроциклических ониеовых производных урацила, 8 ациклических ониеовых производных урацила, 4

представителя ациклических ониевого производных хиразолин-2,4-диона и 3 представителя ациклических ониевого производных аллоксазина были синтезированы в лаборатории химии нуклеотидных оснований ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН.

### Биологические объекты

Штаммы тест-микроорганизмов, использованные в работе, перечислены в таблице 1.

Таблица 1.

	Штаммы бактерий	Штаммы микроскопических грибов
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 209p	<i>Aspergillus niger</i> BKMФ-1119
2	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 8035	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>gypseum</i> 1773
3	<i>Escherichia coli</i> CDC F-50	<i>Candida albicans</i> ВКПГу-401/NCТС 885-653
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	
5	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 8043	
6	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 100	

Бактерии были получены из Всероссийской коллекции штаммов микроорганизмов ГНИСКС им. Л.А. Тарасевича г. Москва, грибы из Всероссийской коллекции патогенных грибов (ВКПГ) г. Санкт-Петербург.

Для культивирования тест-микроорганизмов использовали стандартные питательные среды: Бульон Хоттинера для бактерий и среду Сабуро для грибов.

### 1.2. Определение антимикробного действия макроциклических и ациклических ониевого производных урацила

Антибактериальную и противогрибковую активность определяли методом серийных разведений в жидких питательных средах, выявляя концентрацию исследуемого соединения, при которой наблюдалось полное ингибирование роста тест-микроорганизма. Эту концентрацию (мг/л) обозначали как МИК (NCCLS, 2000; NCCLS, 1998).

### 1.3. Воздействие макроциклических и ациклических ониевого производных урацила на биохимические процессы микроорганизмов

1.3.1. Дегидрогеназную активность *S. aureus* 209p и *C. albicans* 885-653 определяли в анаэробных условиях по времени обесцвечивания метиленовой сини методом Тунберга (Rajvaidya, 2006; Несвадьба, 1971).

1.3.2. Липазную активность *S. aureus* 209p и *C. albicans* 885-653 исследовали методом, основанном на титрометрическом определении свободных жирных кислот, образовавшихся в результате гидролиза липидов. (Модифицированный метод Ота, Ямада) (Kashmiri, 2006; Macedo, 1997). В экспериментах использовали суспензии культур *S. aureus* 209p и *C. albicans* 885-653 содержащие  $1 \times 10^9$  кл/мл.

1.3.3. Спектры биомаркерных рибосомных белков *Escherichia coli* F-50 детектировали MALDI-TOF масс-спектрометром Autoflex («Bruker Daltonics», Германия). В качестве контрольного образца, а также внешнего калибратора использовался стандартный набор

белков фирмы «Bruker Daltonics» (Германия). Для получения каждого масс-спектра использовали от 1400 до 2000 импульсов лазера с мощностью излучения, установленной на уровне минимального порогового значения, достаточного для десорбции - ионизации образца. Параметры масс-спектрометра оптимизировали для диапазона  $m/z$  от 3000 до 100000 Да. Для каждого образца записывали спектр, полученный в результате суммирования 10 одиночных спектров (1400-2000 импульсов лазера). Для записи использовали программное обеспечение FlexControl 2.4 (Build 38), а для обработки и анализа масс-спектров FlexAnalysis 2.4 (Build 11) фирмы «Bruker Daltonics» (Германия).

Суспензию клеток *E.coli* F-50 ( $1 \times 10^9$  кл/мл) инкубировали в течение суток с раствором исследуемых соединений в действующих концентрациях. Затем получали масс-спектры рибосомных белков данной культуры. Результаты оценивали по уменьшению или полному исчезновению спектральных пиков.

В качестве позитивного контроля использовали пробы, содержащие стандартный ингибитор белкового синтеза - антибиотик стрептомицин.

#### **1.4. Оценка острой токсичности соединений**

Тест по оценке острой токсичности проводился на лабораторных млекопитающих: белых беспородных мышах обоего пола массой  $19,0 \pm 2,0$  г. Животные содержались на стандартном рационе питания в условиях природного режима освещения помещения при температуре  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  (Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, 2005).

Первичную токсикологическую оценку соединений (в рамках поточного скрининга) при внутрибрюшинном способе (в/б) введения в виде водных растворов (или с добавлением 0,2 % твина-80) проводили в острых опытах на мышах обоего пола массой  $19,0 \pm 2,0$  г. Затем в течение последующих 72 часов проводилось наблюдение за состоянием мышей, регистрировались симптомы интоксикации. Критерием токсичности служил расчетный показатель ЛД<sub>50</sub> – доза (в мкМ), при которой у 50% животных наблюдались смертельные исходы. Для установления ЛД<sub>50</sub>, каждое соединение вводили 4 группам мышей (по 6 особей на каждую дозу;  $n=24$ ). Пересчет доз с мкМ на мг/кг производился по формуле:

$$[\text{мг/кг}] = (\text{мкМ} \times \text{молекулярная масса}) / 1000$$

Все изученные соединения ранжировались согласно классификации острой токсичности веществ при введении в брюшную полость животного (Измеров и др., 1977).

#### **1.5. Оценка гемолитического действия макроциклических и ациклических ониевых производных урацила**

Оценку гемолитического действия исследуемых соединений проводили по ГОСТ Р ИСО 10993.4-99. Метод основан на сравнении оптической плотности раствора исследуемого вещества с кровью с оптической плотностью крови при 100 % гемолизе. Для исследований использовали 10% взвесь эритроцитов человека (I «+») и барана.

#### **1.6. Определение генотоксичности макроциклических и ациклических ониевых производных урацила**

Способность препаратов индуцировать генные мутации в клетках бактерий



определяли в тесте Эймса без метаболической активации по реверсии тест-штамма *Salmonella typhimurium* TA 100 ауксотрофного по гистидину к прототрофности (Ames et al., 1973; Maron, Ames, 1983).

**1.7. Статистическую обработку** полученных результатов проводили с помощью программ Microsoft Office Excel 2007. Достоверность различий средних значений оценивали с использованием коэффициента Стьюдента ( $P \leq 0,05$ ). Взаимосвязь ряда данных устанавливали с помощью коэффициента корреляции. Табличные и графические данные содержат средние значения и стандартную ошибку.

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1. Определение антимикробного действия исследуемых соединений

#### 2.1.1. Антимикробная активность макроциклических ониевого производных урацила

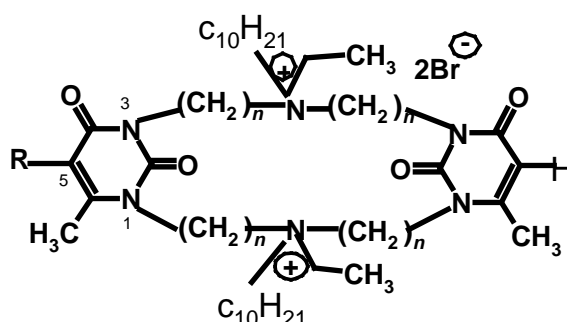


Рис. 1. Общая формула макроциклических ониевого производных урацила

Таблица 2. Антимикробная активность макроциклических ониевого производных урацила

№ соединения	n	R	Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) (мг/л)							
			Гр+			Гр-		Грибы		
			<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. niger</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>C. albicans</i>
(4)	5	H	<b>0.97</b> ±0.09	1.95 ±0.19	500 ±49	62.5 ±5.8	500 ±49	250 ±25	125 ±12	125 ±12
(5)	6	H	<b>0.97</b> ±0.09	1.95 ±0.18	156.0 ±16	62.5 ±6.2	500 ±49	250 ±24	125 ±12	125 ±12
(6)	5	All	<b>0.24</b> ±0.02	3.9 ±0.4	390 ±39	15.6 ±1.5	250 ±25	250 ±24	6.25 ±0.62	<b>1.9</b> ±0.2
Триэтилдециламмония бромид			2,5 ±0,2	50 ±4,5	—	156 ±12	—	—	500 ±41	62,5 ±4,9
Ципрофлоксацин			<b>0.25</b> ±0.02	0.25 ±0.02	3.9 ±0.4	0.50 ±0.05	0.50 ±0.05			
Офлоксацин			<b>0.97</b> ±0.09	1.5 ±0.1	15.6 ±1.5	0.50 ±0.05	3.1 ±0.3			
Кетоконазол									<b>3.9</b> ±0.4	<b>3.9</b> ±0.4

(—) МИК >500 мг/л, All-радикал аллил ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$ )

Антимикробную активность макроциклических ониевого производных урацила наблюдали в пределах (0.24 - 500) мг/л. В таблице 2 представлены значения МИК самых

активных макроциклических производных урацила. Соединение **6**, содержащее в 5 положении урацилового фрагмента радикал аллил, проявило антибактериальную активность против *S. aureus* 209 P на уровне ципрофлоксацина (МИК-0,24 мг/л). Противогрибковая активность данного соединения в отношении *C. albicans* 885–653 в 2 раза превышает значение активности противогрибкового препарата кетоконазола. Соединения **4** и **5**, с незамещенным 5 положением в урациловом фрагменте оказались узко специфичны в отношении грамположительных бактерий (*S. aureus* 209 P и *B. cereus* 8035), антимикробная активность проявлялась на уровне антибиотика офлоксацина (МИК-0,97 мг/л). В отношении *E. faecalis* 8043, высоких значений активности выявлено не было (МИК 156-500 мг/л). Грамотрицательные бактерии, также оказались устойчивыми к исследуемым макроциклическим соединениям – МИК (15,6-500) мг/л.

### 2.1.2. Антимикробная активность ациклических ониевых производных урацила

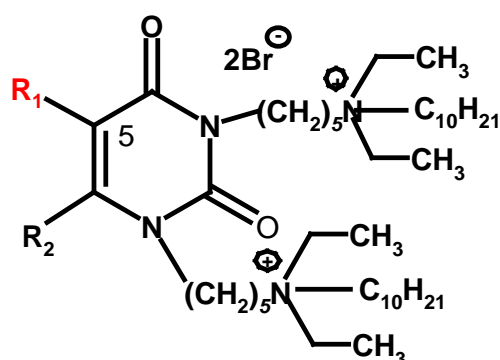


Рис. 2. Общая формула ациклических ониевых производных урацила

Таблица 3. Антимикробная активность ациклических ониевых производных урацила

№ Соединения	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) (мг/л)							
			Гр+			Гр-		Грибы		
			<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. niger</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>C. albicans</i>
(7)	NO <sub>2</sub>	H	<b>0.97</b> ±0.09	15.6 ±1.5	125 ±12	15.6 ±1.6	—	—	31.3 ±3.0	<b>0.97</b> ±0.09
(8)	CH <sub>3</sub>	H	<b>0.97</b> ±0.09	6.3 ±0.6	125 ±12	15.6 ±1.5	500 ±49	125 ±12	12.5 ±12	<b>0.97</b> ±0.09
(9)	C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	CH <sub>3</sub>	<b>0.97</b> ±0.09	<b>0.50</b> ±0.05	125 ±12	62.5 ±6.2	250 ±25	500 ±50	62.5 ±6.0	<b>0.97</b> ±0.09
Триэтилдециламмония бромид			2,5 ±0,2	50 ±4,5	—	156 ±12	—	—	500 ±41	62,5 ±4,9
Офлоксацин			<b>0.97</b> ±0.09	<b>1.5</b> ±0.1	15.6 ±1.5	0.50 ±0.05	3.1 ±0.3			
Амфотерицин В								20.0 ±1.9	3.1 ±3.0	<b>0.97</b> ±0.09

(—) МИК >500 мг/л

Антимикробная активность ациклических ониевых производных урацила наблюдалась в диапазоне концентраций (0,5-500) мг/л. Соединения **7**, **8** и **9** проявляют

антибактериальную активность в отношении *S. aureus* 209 P и *B. cereus* 8035 на уровне офлоксацина, а противогрибковую активность в отношении *C. albicans* 885-653 на уровне препарата амфотерицина В (МИК-0,97 мг/л). Наиболее активным оказалось соединение **9**, содержащее в 5 положении урацилового фрагмента радикал децил ( $C_{10}H_{21}$ ). Значение активностей в отношении *E. faecalis* 8043 и грамотрицательных бактерий, как и в случае макроциклических производных значительно ниже (Таблица 3).

**2.1.3.** В ряду ациклических ониевых производных хиназолин-2,4-диона получено соединение **12**, обладающее высокой антибактериальной активностью в отношении всех грамположительных бактерий, включая *E. faecalis*. Значения МИК проявляются на уровне ципрофлоксацина. Против грамотрицательных бактерий соединение **12** менее активно, но в отношении *P. aeruginosa* 9027 наблюдалась самая высокая антибактериальная активность (МИК – 31.3 мг/л) по сравнению с макроциклическими и ациклическими ониевыми производными урацила. Однако по противогрибковым свойствам производные хиназолин-2,4-диона значительно уступают вышеописанным соединениям.

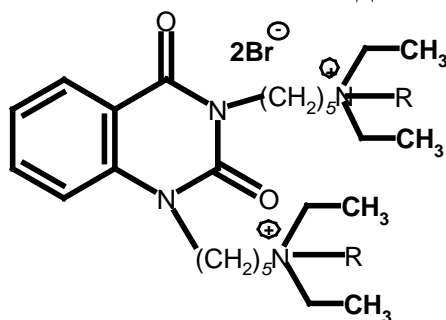


Рис.3. Общая формула ациклических ониевых производных хиназолин-2,4-диона

Таблица 4. Антимикробная активность ациклических ониевых производных хиназолин-2,4-диона

№ Соединения	R	Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) (мг/л)							
		Гр+			Гр-		Грибы		
		<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. niger</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>C. albicans</i>
(10)	$C_{16}H_{33}$	250 ±25	500 ±49	—	—	—	—	—	—
(11)	$C_5H_{11}$	31.3 ±3.0	125 ±12	500 ±49	—	—	—	62.5 ±6.1	62.5 ±6.2
(12)	$C_{10}H_{21}$	<b>0.20</b> <b>±0.02</b>	1.95 ±0.19	<b>3.9</b> <b>±0.4</b>	15.6±1. 5	31.3 ±3.0	250± 25	31.3 ±3.0	31.3 ±3.1
Триэтилдециламмония бромид		2,5 ±0,2	50 ±4,5	—	156 ±12	—	—	500 ±41	62,5 ±4,9
Ципрофлоксацин		<b>0.25</b> <b>±0.02</b>	0.50 ±0.05	<b>3.9</b> <b>±0.4</b>	0.50 ±0.04	0.50 ±0.05	-	-	-
Кетоконазол		-	-	-	-	-	-	3.9 ±0.4	3.9 ±0.4

(—) МИК >500 мг/л

**2.1.4.** Ациклические ониевые производные аллоксазина, как и ациклические ониевые производные урацила показали высокую антимикробную активность в отношении

грамположительных бактерий и грибов (Таблица 5). Антибактериальная активность соединений **14** и **15** в отношении *S. aureus* 209 P и *B. cereus* 8035 проявлялась на уровне ципрофлоксацина и офлоксацина. Соединение **14** показало самую высокую противогрибковую активность из всех исследованных соединений. В отношении *C. albicans* 885-653 активность этого соединения проявлялась на уровне клотримазола, а в отношении *T. mentagrophytes* 1773 в 8 раз превышала значение МИК известного противогрибкового средства.

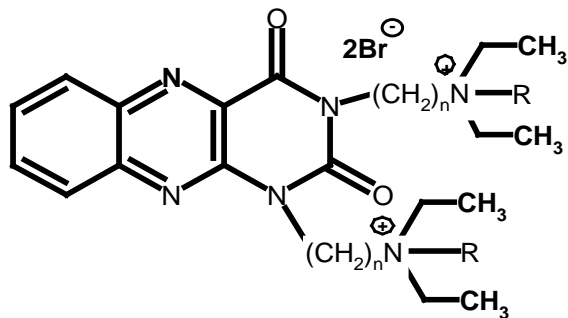


Рис.4. Общая формула ациклических ониевых производных аллоксазина

Таблица 5. Антимикробная активность ациклических ониевых производных аллоксазина

№ соединения	n	R	Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) (мг/л)							
			Гр+			Гр-		Грибы		
			<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. niger</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>C. albicans</i>
(13)	5	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	—	—	—	—	—	—	—	—
(14)	5	C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	<b>0.24</b> ±0.02	<b>0.24</b> ±0.02	500 ±49	3.1 ±0.3	125 ±12	125 ±12	<b>0.39</b> ±0.04	<b>0.39</b> ±0.03
(15)	6	C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	<b>0.97</b> ±0.09	<b>1.5</b> ±0.14	—	12.5 ±1.2	500 ±48	—	1.9 ±0.1	1.9 ±0.1
Триэтилдециламмония бромид			2,5 ±0,2	50 ±4,5	—	156 ±12	—	—	500 ±41	62,5 ±4,9
Ципрофлоксацин			<b>0.25</b> ±0.02	<b>0.25</b> ±0.02	3.9 ±0.4	0.50 ±0.05	0.50 ±0.05	-	-	-
Офлоксацин			<b>0.97</b> ±0.09	<b>1.5</b> ±0.1	15.6 ±1.5	0.50 ±0.05	3.1 ±0.3	-	-	-
Клотримазол			-	-	-	-	-	-	<b>3.1±0.3</b>	<b>0.39±0.03</b>

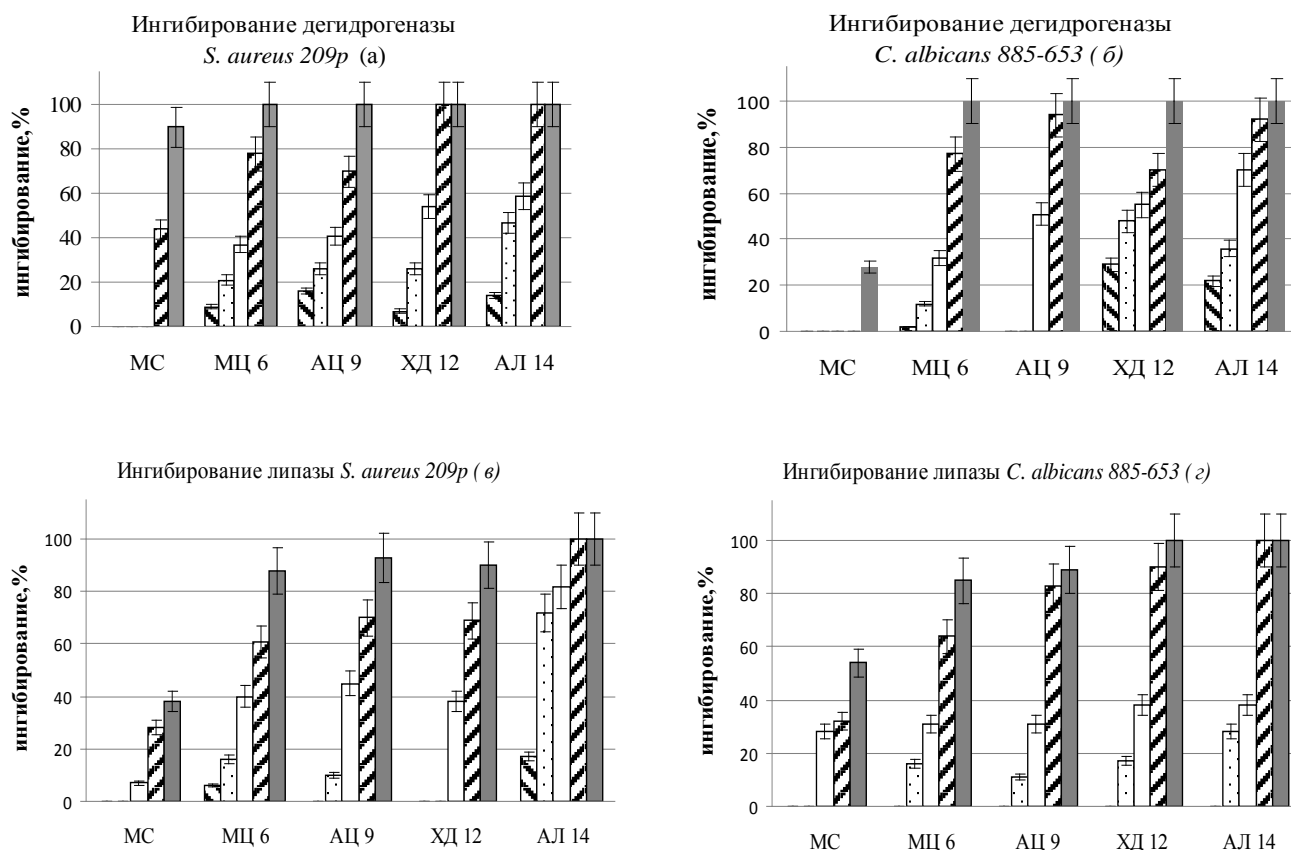
(—) МИК >500 мг/л

## 2.2. Оценка влияния макроциклических и ациклических ониевых производных урацила на биохимические процессы микроорганизмов

### 2.2.1. Влияние исследуемых соединений на дегидрогеназы и липазы *S. aureus* 209-P и *C. albicans* 885-653.

В отличие от триэтилдециламмония бромида все исследованные соединения начинают ингибировать дегидрогеназную активность *S. aureus* 209-P в диапазоне малых концентраций 0,05-5 мг/л (рис. 5а). Производные аллоксазина в концентрации 0,5 мг/л угнетают действие фермента на 47 %, а в концентрации 5 мг/л на 60%. Дегидрогеназную активность *C. albicans* 885-653 наиболее сильно ингибируют производные хиназолин-2,4-диона и аллоксазина (рис. 5 б). В концентрации 0,05 мг/л процент ингибирования составил

29% и 22%, в концентрации 0,5 мг/л - 48 % и 36 %, а в концентрации 5 мг/л - 55% и 70 % соответственно. Триэтилдециламмония бромид незначительно ингибирует дегидрогеназную активность *C. albicans* 885-653 только в высокой концентрации 500 мг/л. Липазную активность *S. aureus* 209-*P* наиболее активно угнетают производные аллоксазина (в концентрации 0,5 мг/л на 72 %, 5 мг/л – 82 %) (рис. 5в). Остальные соединения менее активны в отношении этого фермента. На липазную активность *C. albicans* 885-653 самое сильное воздействие оказывают производных аллоксазина (в концентрации 5 мг/л – ингибирование 38 %) (рис. 5г).



Концентрации соединений: ■ 500 мг/л ▨ 50 мг/л □ 5 мг/л ▤ 0,5 мг/л ▦ 0,05 мг/л

Рис. 5. Влияние исследуемых соединений на дегидрогеназную и липазную активности *S. aureus* 209-*P* и *C. albicans* 885-653. МС - модельное соединение (триэтилдециламмония бромид); МЦ- макроциклическое ониевое производное урацила; АЦ- ациклическое ониевое производное урацила; ХД- ациклическое ониевое производное хиназолин-2,4-диона; АЛ- ациклическое ониевое производное аллоксазина.

## 2.2.2. Влияние макроциклических и ациклических ониевых производных урацила на синтез биомаркерных рибосомных белков *Escherichia coli* F 50

При помощи метода масс-спектрометрии MALDI-TOF были получены масс-спектры рибосомных белков *E.coli* F-50 с молекулярными массами 9064, 9229, 9533 и 9735 Да (рис. 6 А). Анализ масс-спектров рибосомных белков *E.coli* F-50 после воздействия на них стрептомицина в МИК-25 мг/л показал, что первый пик, соответствующий белку S12 (масса

9064 Да), практически полностью исчезает (рис. 6 Б).

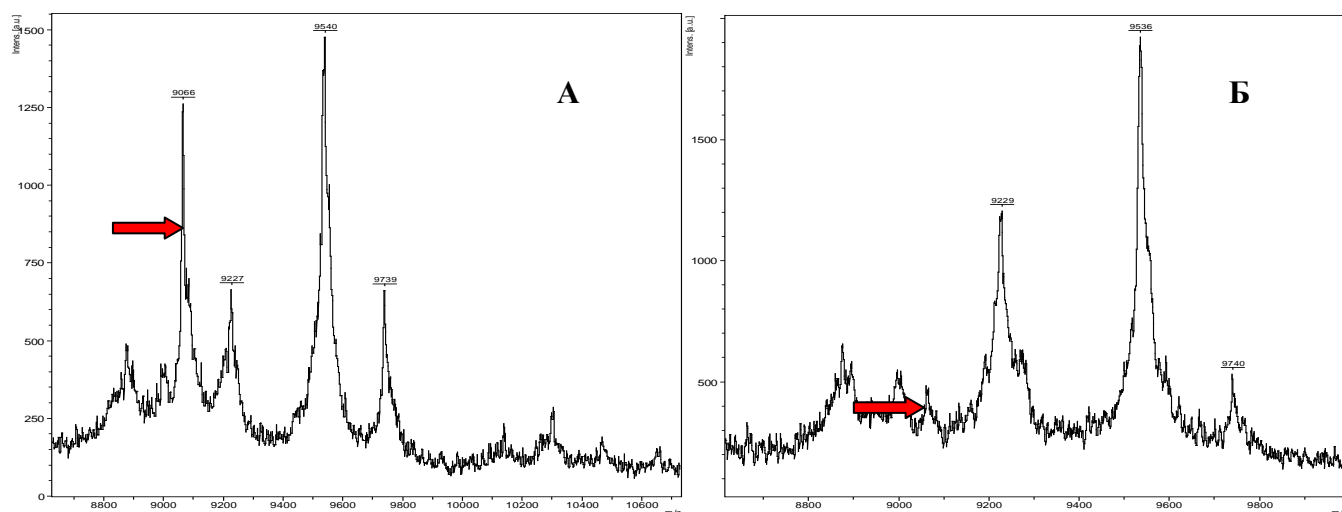


Рис. 6. Влияние антибиотика стрептомицина на биосинтез биомаркерных рибосомных белков *Escherichia coli* F 50: А) контроль – масс-спектры рибосомных белков *E.coli* F-50 с молекулярными массами 9064, 9229, 9533 и 9735 Да; Б) воздействие стрептомицина в МИК-25 мг/л на биосинтез рибосомных белков *E.coli* F-50).

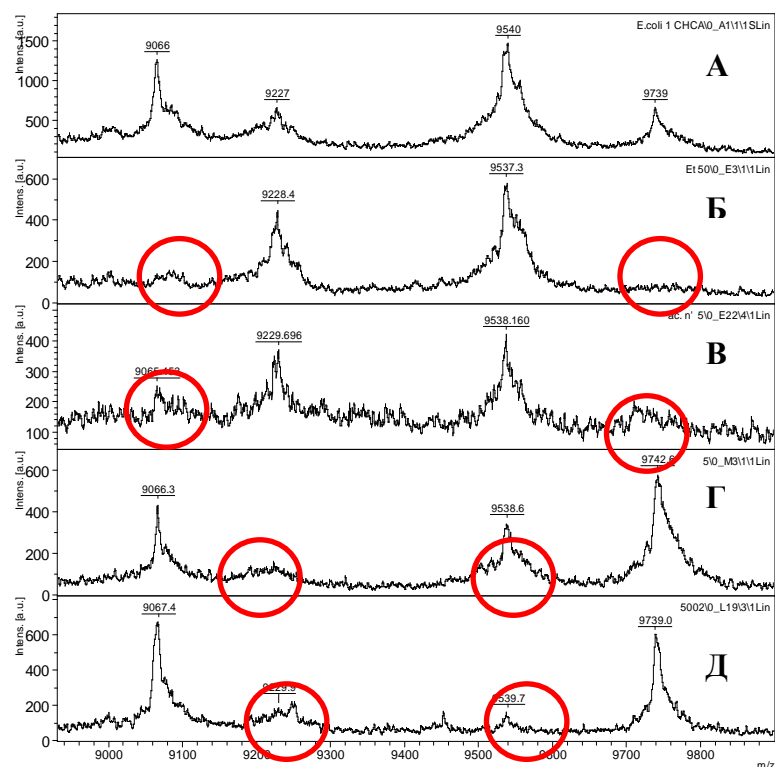


Рис.7. Влияние макроциклических и ациклических ониевых производных урацила на биосинтез биомаркерных рибосомных белков *Escherichia coli* F 50: А) контроль – масс-спектр рибосомных белков *E. coli* F-50; Б) влияние триэтилдециламмония бромид; В) влияние ациклического ониевого производного урацила (соединение **9**); Г) влияние производного хиразолин-2,4-диона (соединение **12**); Д) влияние производного аллоксазина (соединение **14**).

Далее было изучено влияние представителей каждого ряда исследованных

соединений в МИК на биосинтез рибосомных белков *E.coli F-50* (рис. 7). Триэтилдециламмония бромид (рис.7 Б) и ациклическое ониеовое производное урацила (соединение **9**) (рис. 7 В) как и стрептомицин оказывают сильное воздействие на спектр рибосомного белка S12, а также на 4 рибосомный белок (9735 Да). Производные хиназолин-2,4-диона и аллоксазина способствуют уменьшению спектров второго и третьего рибосомных белков с массами 9229, 9533 (соединения **12**, **14**) (рис. 7 Г, Д).

Воздействие макроциклического ониеового производного урацила с самой высокой антимикробной активностью (соединение **6**) приводит к значительному уменьшению спектра третьего рибосомного белка с массой 9533 Да (рис. 8).

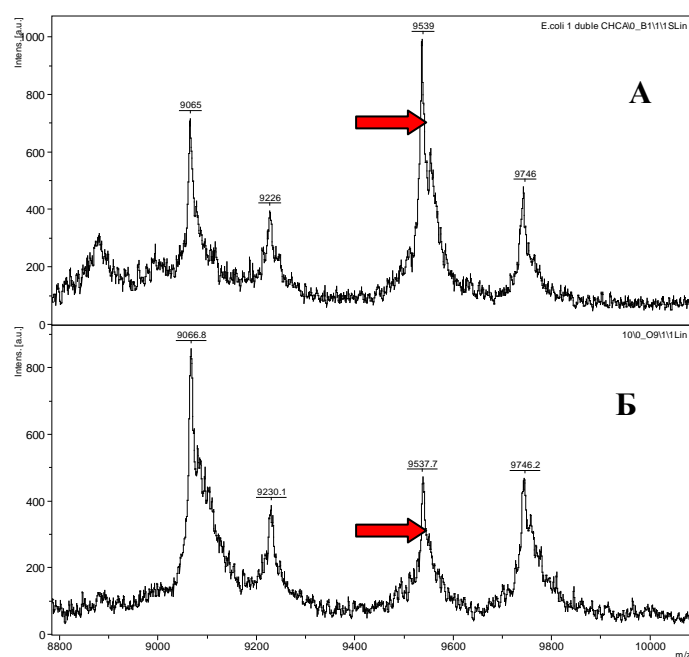


Рис. 8. Воздействие макроциклического ониеового производного урацила **6** на биосинтез биомаркерных рибосомных белков *E. coli F-50* (А) контроль- спектр рибосомных белков *E. coli F-50*; Б) Влияние макроциклического ониеового производного урацила (**6**).

### 2.3. Изучение острой токсичности макроциклических и ациклических ониеовых производных урацила

Для соединений обладающих высокой антимикробной активностью была проведена оценка острой токсичности (Таблица 6). Все протестированные соединения относятся к категории веществ «умеренно токсичных» (III класс опасности по степени воздействия на организм).

Таблица 6. Острая токсичность исследованных соединений

№ соединения	ЛД <sub>50</sub> ; мг/кг, внутрибрюшинно, мыши.
МЦ-4	18,8 (16.3÷21.6)
МЦ-4	18,8 (16.3÷21.6)
МЦ-6	22.6 (19.9÷25.4)
АЦ-7	19.8 (17.3÷22.5)
АЦ-9	17.5 (15.6÷19.8)
ХД-12	18,6 (16,1÷22.5)

АЛ-14	20.9 (17.6÷24.7)
АЛ-15	19,2 (14.9÷23.1)
Триэтилдециламмония бромид	28.3 (22.9÷34.8)
Грамицидин С	28.0 (25.4÷31.5)

МЦ (4 - 6) – макроциклические ониевые производные урацила; АЦ (7, 9) – ациклические ониевые производные урацила; ХД (12) ациклическое ониевое производное хиназолин-2,4-диона; АЛ (14, 15) – ациклические ониевые производные аллоксазина.

#### 2.4. Оценка гемолитического действия макроциклических и ациклических ониевых производных урацила

Из каждого ряда, исследуемых соединений был выбран представитель с самой высокой антимикробной активностью для оценки гемолитического действия. Соединения исследовали в минимальных концентрациях вызывающих ингибирование роста бактерий и грибов. В соответствии с ГОСТ Р ИСО 10993 4-99, если гемолиз  $\geq 2$  %, вещество считают гемолитически активным. Все протестированные соединения в исследованных концентрациях не обладают гемолитическим действием (рис. 9).

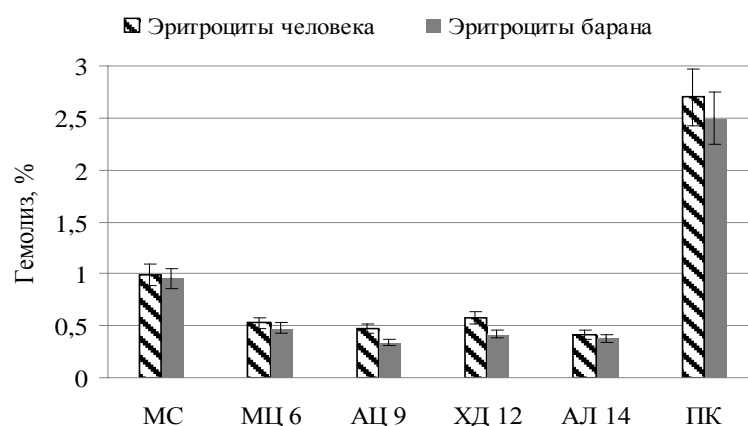


Рис. 9. Гемолитическое действие макроциклических и ациклических ониевых производных урацила.

Концентрации соединений (мг/л): триэтилдециламмония бромид (МС) - 62,5; макроциклическое ониевое производное урацила (МЦ 6) – 15,6; ациклическое ониевое производные урацила (АЦ 9) – 0,97; производное хиназолин-2,4-диона (ХД 12) – 31,3; производное аллоксазина (АЛ 14) – 0,39, ПК-0,5 % NaCl.

#### 2.5. Генотоксические свойства макроциклических и ациклических ониевых производных урацила

Для оценки мутагенного эффекта использовали те же концентрации исследуемых соединений, что и при определении гемолиза. В тесте Эймса без метаболической активации было показано, что число индуцируемых ониевыми соединениями His<sup>+</sup> ревертантов не превышало спонтанный фон мутирования (рис. 10).

Так как число колоний-ревертантов в опыте и контроле различаются менее чем в 2,5 раза, можно считать, что макроциклические и ациклические ониевые производные урацила в исследуемых концентрациях не обладают мутагенной активностью.



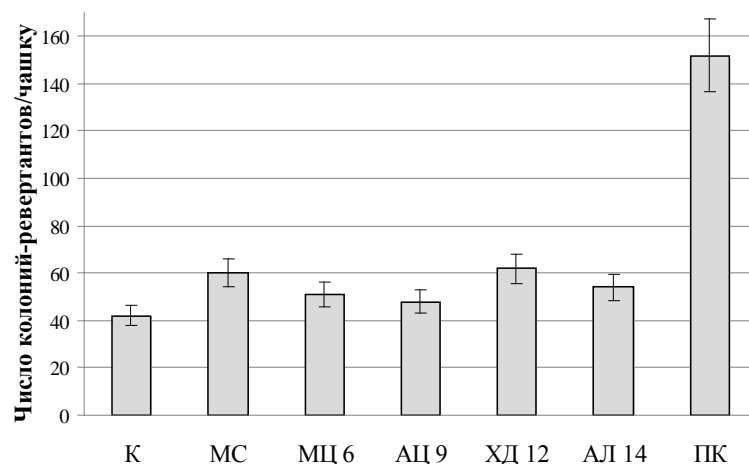


Рис. 10. Оценка мутагенного эффекта макроциклических и ациклических ониевых производных урацила.

Концентрации соединений (мг/л): триэтилдециламмония бромид (МС) - 62,5; макроциклическое ониевое производное урацила (МЦ 6) – 15,6; ациклическое ониевое производное урацила (АЦ 9) – 0,97; производное хиназолин-2,4-диона (ХД 12) – 31,3; производное аллоксазина (АЛ 14) – 0,39; ПК – позитивный контроль (азид Na); К – контроль (спонтанный фон мутирования).

### 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

#### 3.1. Антимикробная активность макроциклических и ациклических ониевых производных урацила

Макроциклические ониевые производные урацила узко специфичны в отношении грамположительных бактерий *S. aureus* 209-P и *Bacillus cereus* 8035. Такая избирательность действия, по всей видимости, связана с трехмерным строением их молекул, соответствие которых трехмерной структуре биомишени может обеспечивать возможность селективного и прочного связывания. Большая конформационная однородность макроциклических производных, по сравнению с ациклическими соединениями, позволяет им достигать определенной биомишени без неспецифических потерь. Подобным образом действуют многие природные антибиотики и токсины, имеющие сложную циклическую структуру.

Очевидно, что антимикробная активность макроциклических производных связана с присутствием в их молекулах пиримидинового фрагмента. По видимому, в данном случае, макроциклические производные нуклеотидных оснований выступают в качестве неспецифического фрагмента, усиливающего антимикробное действие специфического фармакофора (ониевая группа, содержащая липофильный радикал децил) и даже придает ему новую направленность (селективность по отношению к грамположительным бактериям).

Ациклические ониевые производные урацила, как и макроциклические соединения, обладают высокой антибактериальной активностью в отношении грамположительных бактерий. Причем в отношении *E. faecalis* 8043 антимикробная активность большинства ациклических производных 3 раза выше, чем у самого активного макроцикла.

Установлено, что ациклические ониевые производные урацила оказались более

активными в отношении грибов и грамотрицательных бактерий. Такие изменения антимикробных свойств, в сторону расширения спектра действия, возможно, связаны с меньшей конформационной однородностью ациклических производных урацила по сравнению с макроциклическими производными.

Переход к конденсированным производным урацила содержащим хиназолин-2,4-дионовый фрагмент приводит к появлению селективности по отношению к бактериям и снижению противогрибковой активности.

Введение аллоксазинового фрагмента позволило получить соединение с самой высокой антимикробной активностью и широким спектром действия.

Модельное соединение (триэтилдециламмония бромид), являющееся классическим ПАВ, значительно уступает по активности всем исследованным соединениям.

Таким образом, очевидным является влияние природы заместителей при урациловом фрагменте на антимикробную активность, и полученные данные позволяют говорить о специфическом механизме действия, обусловленном непосредственно урациловым фрагментом и структурными особенностями соединения, а не только их солюбилизирующей способностью, что наблюдается в случае классических ПАВ.

Анализ связи «структура - активность», показал, что основными структурными факторами, влияющими на антимикробную активность исследованных соединений являются: 1) присутствие децильного радикала в составе ониевого групп; 2) пента- и гексаметиленовые цепи между атомами азота ониевого группы и N-гетероцикла.

### **3.2. Оценка влияния макроциклических и ациклических оиевых производных урацила на биохимические процессы микроорганизмов**

**3.2.1.** Влияние макроциклических и ациклических оиевых производных урацила на активности дегидрогеназ и липаз *S. aureus* 209-*P* и *C. albicans* 885-653.

В связи с тем, что обмен веществ в клетках микроорганизмов неразрывно связан с деятельностью ферментов и ни одна биохимическая реакция не происходит без их участия, совершенно очевидно, что изучение влияния различных веществ (в том числе и лекарственных препаратов) на процессы метаболизма клеток связано с исследованием их воздействия на ферментативные процессы.

Были проведены эксперименты, позволяющие оценить влияние исследуемых соединений на такие важные ферменты в клетке, как дегидрогеназы и липазы, так как изменение активности данных ферментов в достаточной степени отражает динамику развития патологических процессов, возникающих в организме. Многими исследователями отмечается угнетение активности дегидрогеназ и липаз микроорганизмов различными антимикробными и химиотерапевтическими препаратами (Очерки по микробиологии, 2011–2014), (Plewig, 1993).

Были проведена оценка влияния исследуемых соединений на дегидрогеназы и липазы *S. aureus* 209-*P* и *C. albicans* 885–653. Выбор тестерных штаммов был связан с тем, что эти микроорганизмы оказались наиболее чувствительными ко всем исследованным соединениям.

Полученные результаты показали, что отличие от триэтилдециламмония бромида все исследованные соединения достаточно активно ингибируют дегидрогеназы *S. aureus* 209-*P* и *C. albicans* 885–653.

На основе этих данных можно предположить, что механизм действия исследованных соединений связан с ингибированием ферментных систем дыхательной цепи микроорганизмов на ранних стадиях взаимодействия с клеточными мишенями, что приводит к нарушению нормального течения синтеза жизненно необходимых соединений в клетке микроорганизма.

Липазы *S. aureus* 209-*P* и *C. albicans* 885–653 наиболее сильно угнетают производные аллоксазина. Остальные соединения менее активны в отношении этих ферментов. Возможно, влияние этого ряда соединений на микроорганизмы вызывает нарушение метаболических процессов в клетках, связанных с действием липолитических ферментов.

### **3.2.2. Влияние макроциклических и ациклических ониевого производных урацила на синтез биомаркерных рибосомных белков *Escherichia coli* F 50**

Использование метода масс-спектрометрии MALDI-TOF позволило достаточно точно проиллюстрировать механизм действия известного антибиотика стрептомицина. Исчезновение пика белка S12 свидетельствует, по всей видимости, о нарушении его синтеза в клетках *E. coli* F 50.

Получив достаточно четкую картину воздействия известного антибиотика на синтез рибосомных белков *E. coli* F 50, мы предприняли попытку изучить влияние макроциклических и ациклических ониевого производных урацила на биосинтез биомаркерных рибосомных белков *E. coli* F 50 при помощи метода MALDI-TOF масс-спектрометрии. Анализ полученных результатов позволил предположить, что механизм действия исследованных соединений связан с нарушением синтеза белка в бактериальной клетке.

### **3.3. Оценка острой токсичности, гемолитического действия и генотоксических свойств макроциклических и ациклических ониевого производных урацила**

Полученные результаты свидетельствуют о том, что все протестированные соединения относятся к категории веществ «умеренно токсичных» (III класс опасности по степени воздействия на организм). Токсические свойства исследуемых соединений проявляются на уровне известного антибиотика Грамицидина С, но в отличие от него ониевого производные урацила не обладают гемолитическим действием. Генотоксических свойств в тесте Эймса в рядах макроциклических и ациклических ониевого производных урацила не выявлено.

Таким образом, анализ полученных результатов показал, что исследованные соединения могут быть рекомендованы для работы с живыми объектами.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Макроциклические и ациклические ониевого производные урацила проявили высокую антимикробную активность на уровне известных препаратов: ципрфлоксацина, офлоксацина, клотримазола, кетоконазола, амфотерицина В. Установлена связь структуры

исследованных соединений с их антимикробной активностью. В ряду макроциклических ониевых производных урацила были выявлены узко специфичные в отношении грамположительных бактерий соединения, Ациклические ониевые производные урацила оказались менее специфичными в отношении использованных в экспериментах микроорганизмов и проявили достаточно высокую противогрибковую активность на уровне широко применяемых препаратов клотримазола, кетоконазола и амфотерицина В. Данные по изучению воздействия макроциклических и ациклических ониевых производных урацила на биохимические процессы микроорганизмов позволили предположить, что механизм действия этих соединений связан с ингибированием таких важных ферментов клетки как дегидрогеназы и липазы и биосинтеза белка. В ходе экспериментов было установлено, что все протестированные соединения относятся к категории «веществ умеренно токсичных», не проявляют гемолитических и мутагенных свойств и могут применяться для работы с живыми объектами.

Дальнейшие исследования, направленные на более тщательное изучение механизма действия и новых фармакологических свойств, помогут разработать стратегию для создания нового класса биологически активных веществ.

### ВЫВОДЫ

1. В отношении грамположительных бактерий макроциклические и ациклические ониевые производные урацила демонстрируют антимикробную активность на уровне ципрофлоксацина и офлоксацина (МИК = 0,2-3,9 мг/л); в отношении грамотрицательных бактерий наиболее активны ациклические производные хиначинолин-2,4-диона и аллоксазина (МИК=3,1-31,3 мг/л); в отношении грибов наиболее активны ациклические производные аллоксазина и урацила противогрибковая активность которых, проявляется на уровне кетоконазола, клотримазола и амфотерицина В (МИК=0,39-3,9мг/л).

2. Анализ связи «структура - активность», показал, что макроциклические ониевые производные урацила проявляют селективные свойства в отношении грамположительных бактерий. Ациклические ониевые производные оказались менее специфичными и проявили высокую антимикробную активность как в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, так и в отношении грибов.

Основными структурными факторами, влияющими на антимикробную активность исследованных соединений являются: 1) присутствие децильного радикала в составе ониевых групп; 2) пента- и гекса-метиленовые цепи между атомами азота ониевой группы и N-гетероцикла.

3. Максимальное угнетение активности дегидрогеназ и липаз достигается при действии производных аллоксазина: дегидрогеназная активность *S.aureus* 209-*p* ингибируется на 60%, *Candida albicans* 885-653 - на 70%, липазная активность *S. aureus* 209-*p* ингибируется на 82%, *C. albicans* 885-653 - на 38%. Все исследованные соединения оказывают воздействие на биосинтез белка в клетках *E.coli* F 50.

4. Макроциклические и ациклические ониевые производные урацила относятся к категории веществ «умеренно токсичных» (мыши, внутривенно *in vivo*).

5. Исследованные соединения не проявляют гемолитических и генотоксических свойств *in vitro*.
6. Макроциклические и ациклические уриновые производные урацила могут быть рекомендованы к разработке в качестве антимикробных препаратов, как селективных в отношении грамположительных бактерий (макроциклические производные), так и обладающие более широким спектром действия (ациклические производные аллоксазина и урацила).

**Публикации по теме диссертации в изданиях, рекомендованных ВАК:**

1. Zakharova, L. Ya. Amphiphilic macrocycles bearing biofragment: Molecular design as factor controlling self-assembly / L. Ya. Zakharova, V.E. Semenov, V.V. Syakaev, M.A. Voronin, D.R. Gabdrakhmanov, F.G. Valeeva, A.S. Mikhailov, **A.D. Voloshina**, V.S. Reznik, Sh. K. Latypov, A.I. Konovalov // A.I. Materials Science and Engineering. - 2014. - Vol. 38. - No. 1. - P. 143-150.
2. . Semenov, V.E. Antimicrobial Activity of Pyrimidinophanes with Thiocytosine and Uracil Moieties / V.E. Semenov, A.S. Mikhailov, **A.D. Voloshina**, N.V. Kulik, A.D. Nikitashina, V.V. Zobov, S.V. Kharlamov, Sh. K. Latypov, V.S. Reznik // Eur. J. Med. Chem.- 2011. Vol. 46. № 9. P. 4715 – 4724.
3. Николаев, А.Е. Синтез и антимикробная активность пиримидинофанов содержащих один урациловый фрагмент и атом серы в мостике / А.Е. Николаев, В.Э. Семенов, **А.Д. Волошина**, Н.В. Кулик, В.С. Резник // Хим.-фарм. ж. - 2010. - № 3.- С. 21 - 24.
4. Семенов, В.Э. n-Толуолсульфонаты пиримидинофанов - водорастворимые пиримидинсодержащие макроциклы / В.Э. Семенов, Е.С. Романова, А.С. Михайлов, **А.Д. Волошина**, Н.В. Кулик, С.Ю. Уралева, А.В. Козлов, Ш.К. Латыпов, В.С. Резник // Журнал общей химии - 2009. - Т. -79 - № 1 - С. 138 - 141.
5. Семенов, В.Э. Антимикробная активность пиримидинофанов, содержащих два урациловых фрагмента и атом азота в мостиках / В.Э. Семенов, **А.Д. Волошина**, Н.В. Кулик, С.Ю. Уралева, Р.Х. Гиниятуллин, А.С. Михайлов, В.Д. Акамсин, Ю.А. Ефремов // Хим.-фарм. ж. - 2009. - № 8 - С. 21 - 26.
6. Semenov, V.E. Antibacterial and antifungal activity of macrocyclic uracil derivatives with quarternized nitrogen atoms in spacers / V.E. Semenov, **A.D. Voloshina**, E.M. Toroptzova, N.V. Kulik, V.V. Zobov, R. Kh. Giniyatullin, A.S. Mikhailov, A.E. Nikolaev, V.D. Akamsin, V.S. Reznik // Eur. J. Med. Chem. - 2006. - Vol. 41 - № 9 - P. 1093 - 1101.
7. Семенов, В.Э. Амфифильные пиримидинофаны и мультипиримидинофаны: синтез и антимикробная активность / Семенов, Р.Х. Гиниятуллин, А.С. Михайлов, А.Е. Николаев, **А.Д. Волошина**, Н.В. Кулик, В.В. Зобов, В.С. Резник // Первая Российская конференция по медицинской химии (MedChem Russia – 2013), 8 – 12 сентября 2013 г., Москва. – Тезисы докладов. – С. 139.
8. Nikolaev, A.E. Dimeric pyrimidinophanes: synthesis and biological activity / A.E. Nikolaev, V.E. Semenov, R.Kh. Giniyatullin, **A.D. Voloshina**, V.S. Reznik // The 17<sup>th</sup> European Symposium on Organic Chemistry «ESOC 2011», 10 - 15 July 2011, Hersonissos, Crete, Greece. - Abstracts. - P. 53.

9. Nikolaev, A.E. Synthesis and antimicrobial activity of amphiphilic macrocycles and their acyclic counterparts / A.E. Nikolaev, V.E. Semenov, R.Kh. Giniyatullin, A.S. Mikhailov, **A.D. Voloshina**, N.V Kulik, V.V Zobov, V.S. Reznik // International Congress on Organic Chemistry, September 18 - 22, 2011, Kazan, Russian Federation. - Book of abstracts. - P. 358.
10. Nikolaev, A.E. Pyrimidinophanes as novel antimicrobial agents / A.E. Nikolaev, V.E. Semenov, **A.D. Voloshina**, R. Kh. Giniyatullin, V.V. Reznik // 47<sup>th</sup> International Conference on Medicinal Chemistry "Drug discovery and selection", 6 - 8 July 2011, Lyon, France. - Book of Abstracts. - P. 178.
11. Семенов, В.Э. Синтез и антимикробная активность амфифильных криптандоподобных и наноразмерных пиримидинофанов / В.Э. Семенов, Р.Х. Гиниятуллин, А.С. Михайлов, А.Е. Николаев, **А.Д. Волошина**, Н.В. Кулик, В.В. Зобов, В.С. Резник // Научно-практическая конференция «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения», 23 – 28 мая 2011 г., п. Новый Свет, АР Крым, Украина. - Тезисы докладов. - С. 161.
12. Семенов, В.Э. Амфифильные пиримидинофаны и их ациклические аналоги: синтез и антимикробная активность / В.Э. Семенов, Р.Х. Гиниятуллин, А.С. Михайлов, А.Е. Николаев, **А.Д. Волошина**, Н.В. Кулик, В.В. Зобов, В.С. Резник // Научно-практическая конференция «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения», 25 - 30 мая 2009 г., п. Новый Свет, АР Крым, Украина. – Тезисы докладов. - С. 165 - 166.
13. Семенов, В.Э. Амфифильные урацилсодержащие макроциклы и их ациклические аналоги: синтез и антимикробная активность / В.Э. Семенов, Р.Х. Гиниятуллин, А.С. Михайлов, А.Е. Николаев, **А.Д. Волошина**, Н.В. Кулик, В.В. Зобов, В.С. Резник // Научная конференции «Органическая химия для медицины (Орхимед-2008)», 7-11 сентября, 2008 г., Москва. - Тезисы докладов. – С. 233.
14. Nikolaev, A.E. Pyrimidinophanes with heteroatoms in bridges: synthesis and biological activity / A.E. Nikolaev, V.E. Semenov, R. Kh. Giniyatullin, **A.D. Voloshina**, V.S. Reznik // International symposium «Advances in synthetic and medicinal chemistry», 27 – 31 August, 2007, St. Petersburg. - Abstracts. – P. 217.
15. Семенов, В.Э. Пиримидинофаны, содержащие атомы азота в мостиках: синтез и свойства / В.Э. Семенов, А.Е. Николаев, Р.Х. Гиниятуллин, О.А. Лодочникова, **А.Д. Волошина**, Л.Ф. Галиуллина, Ш.К. Латыпов, В.С. Резник // сб. Химия и биологическая активность синтетических и природных соединений, «Азотсодержащие гетероциклы», Москва: Издано Международным благотворительным фондом «Научное партнерство», МБФНП (ICSPF). – 2006 г., - Т.-1. - С. 450 - 452.
16. Семенов, В.Э. Антимикробная активность пиримидинофанов и изоструктурных им ациклических соединений, содержащих кватернизованные атомы азота в полиметиленовых мостиках / В.Э. Семенов, А.Д. Волошина, Е.М. Торопцова, Н.В. Кулик, В.В. Зобов, Р.Х. Гиниятуллин, А.Е. Николаев, В.С. Резник // сб. Новые лекарственные средства: успехи и перспективы. Уфа: Гилем, 2005 г., С. 203 - 204.